

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : A61K 9/127, 48/00, C12N 15/88</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/02144</b> (43) Date de publication internationale: 22 janvier 1998 (22.01.98)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01304 (22) Date de dépôt international: 15 juillet 1997 (15.07.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/08844 16 juillet 1996 (16.07.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CAPSULIS [FR/FR]; 218-228, avenue du Haut-Lévêque, F-33600 Pessac (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MAHY, Patrick [FR/FR]; Résidence Hameau de Noailles, Appartement 301, Rue Haut Carré, F-33400 Talence (FR). ROUX, Didier [FR/FR]; 6 bis, avenue Langevin, F-33700 Mérignac (FR). LAVERSANNE, René [FR/FR]; 62, avenue du Parc d'Espagne, F-33600 Pessac (FR). AMEDEE, Joëlle [FR/FR]; 10, rue des Anciennes Ecoles, F-33600 Pessac (FR). FREUND, Olivier [FR/FR]; Résidence Val d'Or, Appartement 107, 104, rue de la Médoquine, F-33400 Talence (FR). (74) Mandataires: GIRAUD, Françoise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, MX, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: COMPOSITIONS CONTAINING AT LEAST ONE NUCLEIC ACID (54) Titre: COMPOSITIONS CONTENANT AU MOINS UN ACIDE NUCLEIQUE (57) Abstract The invention concerns a composition containing at least one nucleic acid a part of which at least is enclosed in multilamellar vesicles, characterised in that said vesicles consist of two layers comprising at least one surfactant, the said two layers being concentric and giving said vesicles an onion-like structure. The surfactants used are non-cationic surfactants. The invention concerns the use of such compositions in pharmaceuticals, particularly in gene therapy and in <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> transfection. (57) Abrégé L'invention concerne une composition contenant au moins un acide nucléique dont au moins une partie se trouve inclus à l'intérieur de vésicules multilamellaires, caractérisée en ce que lesdites vésicules sont constituées de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites bicouches étant concentriques et conférant auxdites vésicules une structure en oignon. Les tensionactifs utilisés sont des tensioactifs non cationiques. L'invention concerne l'utilisation de telles compositions dans le domaine pharmaceutique, en particulier en thérapie génique et en transfection <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## COMPOSITIONS CONTENANT AU MOINS UN ACIDE NUCLEIQUE

L'invention concerne de nouvelles compositions contenant au moins  
5 un acide nucléique et leurs applications dans le domaine biomédical, en particulier  
en thérapie génique.

Jusqu'à la fin des années quatre-vingt, l'utilisation des liposomes en  
vue d'applications biomédicales et, plus précisément, en thérapie génique ne  
semblait guère prometteuse. Les résultats de transfection (traduction et expression  
10 d'un gène de cellules procaryotes ou eucaryotes par des cellules eucaryotes),  
essentiellement transitoire, étaient relativement médiocres. Le recours aux  
enveloppes externes de virus a accru très significativement les résultats des  
transferts de gènes dans une multitude de lignées cellulaires *in vitro*. Par contre, il  
est certain que leur utilisation en thérapie humaine et animale soulève des  
15 problèmes étant donné les dangers iatrogènes possibles qu'elles représentent. Vers  
la fin de la décennie précédente, il est apparu que l'utilisation de tensioactifs  
cationiques améliorait très nettement les résultats de transfection. Depuis, malgré  
certains problèmes liés à l'utilisation des vecteurs cationiques de nombreuses  
formulations ont été proposées dont certaines sont brevetées et commercialisées.

20 Trois sortes de vecteurs non-viraux sont en général utilisés :  
- des polymères cationiques,  
- des vecteurs biochimiques constitués d'une protéine cationique  
associée à un récepteur cellulaire,  
- des lipides cationiques associés ou non à des liposomes.

25 Tous ces vecteurs contiennent des molécules cationiques.  
L'utilisation de tels vecteurs se trouve notamment décrite dans les  
publications suivantes :

J.P. Behr et al. Proc. Nat. Ac. Scienc. 86, 6982, 1989  
M. Cotten et Wagner Curr. Opin. Cell Biol. 4, 705, 1993  
30 J. Haensler and F.C. Szoka Bioconjug. Chem. 4, 372, 1993  
C.P. Hodgson Bio Technology 13, 222, 1995  
F.D. Ledley Hum. Gene Ther. 6, 1129, 1995  
J.S. Remy et al. Proc. Nat. Ac. Scienc. 92, 1744, 1995  
V.S. Trubetskoy et al. Biochem. Biophys. Acta 1131, 311, 1992

Deux problèmes essentiels relèvent de l'utilisation des vecteurs cationiques :

- 1 – ces tensioactifs sont généralement cytotoxiques et même si certaines molécules spécifiques ont été développées afin d'en réduire la toxicité, ce problème n'est pas  
5 entièrement résolu,
- 2 – on ne peut pas envisager leur application *in vivo* car ces vecteurs, du fait de leur charge, interagissent très fortement avec les protéines, par exemple, avec celles présentes dans le sérum, ainsi qu'avec les parois cellulaires. Ils se collent donc rapidement sur les cellules voisines du site d'injection, en réduisant la  
10 diffusion systémique.

C'est pourquoi ils trouvent leur utilisation préférentielle *in vitro* pour des cellules en culture, dans le transfert de gènes.

- Il est bien connu que les liposomes sont des structures colloïdales comportant un coeur aqueux séparé du milieu extérieur par une ou plusieurs  
15 bicouches de molécules phospholipidiques. Leur application en cosmétique et en pharmacologie a fait l'objet d'un grand nombre de brevets décrivant de multiples utilisations de ces vecteurs depuis leur découverte dans les années 1960.

- Du point de vue des applications, on a très vite distingué les liposomes composés d'une seule bicouche, des liposomes composés de plusieurs bicouches  
20 souvent désignés par l'abréviation MLV correspondant à la terminologie anglaise "Multi-Layered Vesicles". Les vésicules multicouches ont une taille qui est mal contrôlée et est généralement largement supérieure au micromètre. Parmi les vésicules unilamellaires, on distingue les petites vésicules souvent désignées par l'abréviation SUV correspondant à la terminologie anglaise "Small Unilamellar  
25 Vesicles" dont la taille ne dépasse pas 100 à 300 nm et les grandes vésicules souvent désignées par l'abréviation LUV correspondant à la terminologie anglaise "Large Unilamellar Vesicles" qui peuvent atteindre plusieurs dizaines de micromètres de taille.

- Du fait de leur taille importante, les vésicules multilamellaires (MLV)  
30 n'ont que peu d'utilité dans les applications médicales. En effet, les risques d'embolie que comporte l'introduction de particules de taille supérieure au micromètre dans la circulation sanguine rendent leur utilisation impossible par injection intra-veineuse. De plus, une taille trop importante empêche les vésicules de franchir les barrières tissulaires, permettant de les retrouver dans le sang  
35 lorsqu'elles sont injectées par voie intra-musculaire ou sous-cutanée. Enfin, il n'existe pas de procédés réellement efficaces pour produire des MLV de façon

parfaitement contrôlée. La plus grande partie des applications ont été développées avec des SUV qui répondent aux critères de sécurité et de contrôle nécessaires à une utilisation biomédicale.

On a également décrit dans la littérature l'encapsulation d'acides nucléiques dans des vésicules à base de tensioactifs, généralement lipidiques. Toutes les vésicules décrites à ce jour présentent en commun le fait de présenter plusieurs couches de tensioactifs entourant un coeur liquide. De telles vésicules sont décrites, en particulier, dans les brevets US 4,394,448 et WO-95/16437.

L'un des problèmes pratiques de l'utilisation des liposomes pour la vectorisation des médicaments ou leur utilisation en thérapie génique est le faible rendement dû au fait que le pourcentage de la solution aqueuse de départ effectivement encapsulée dépasse rarement 30 %. De plus, la méthode généralement suivie fait appel à des étapes d'évaporation de solvants organiques intervenant dans le procédé de fabrication. Enfin, les résultats expérimentaux se sont révélés très décevants.

En effet, le processus communément admis pour l'incorporation dans les cellules des vésicules lipidiques, ou des complexes cationiques contenant de l'ADN, passe par un mécanisme d'endocytose. Dans le cytoplasme, l'objet en cours de pénétration est inclus dans un endosome qui contient des enzymes, en particulier des DNases, capables de détruire tout matériel génétique intrus. Les liposomes, du fait de leur faible nombre de membranes lipidiques entourant le corps aqueux ne présentent pas une protection suffisante pour résister à l'action destructrice des protéases et nucléases endosomiales. De ce fait, même s'ils sont efficaces pour pénétrer le cytoplasme de la cellule, les liposomes ne permettent à l'ADN d'atteindre le noyau qu'avec un très faible rendement.

Il est donc crucial de développer des vecteurs synthétiques compatibles avec une utilisation *in vivo* et, ceci, d'autant plus qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, un vecteur efficace pour des molécules susceptibles d'être appliquées en thérapie génique humaine et/ou animale. Seules, les enveloppes virales montrent une efficacité en transfection compatible avec une application humaine ou animale.

Les vésicules de type liposomes ou vésicules paucilamellaires ont en commun d'être constituées d'une ou plusieurs couches lamellaires entourant un coeur aqueux. Outre ce type de vésicules, on connaît également des vésicules multilamellaires qui se différencient structurellement des précédentes par le fait qu'elles présentent une structure dite en "oignon" et sont constituées, de leur centre

jusqu'à leur périphérie, d'une succession de couches lamellaires séparées par un milieu liquide. Ces vésicules peuvent être obtenues par un procédé comprenant la préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide et sa transformation par application d'un cisaillement. Un tel procédé est en particulier décrit dans le brevet  
5 WO 93/19735 issu du brevet français FR-2 689 418 ou WO 95/18601 introduits ici par référence.

Selon le brevet français FR-2 689 418, cette transformation peut être faite lors d'une étape de cisaillement homogène de la phase cristal-liquide, ce qui conduit à des vésicules encore appelées microcapsules de taille contrôlée.  
10 Toutefois, en jouant sur la formulation de la phase lamellaire cristal-liquide, en particulier sur la nature des tensioactifs entrant dans sa composition, la transformation de cette phase cristal-liquide en vésicules peut être obtenue par simple sollicitation mécanique, en particulier lors du mélange des constituants.

Les recherches menées par les inventeurs les ont amenés à découvrir  
15 que l'utilisation des technologies décrites ci-dessus permettait la mise au point de nouveaux vecteurs multilamellaires de petite taille, non cationiques, permettant d'encapsuler, de protéger et de délivrer de l'ADN dans des cellules et, ceci, avec une grande efficacité d'encapsulation ainsi qu'une grande facilité de préparation.

Un autre avantage est que toutes les molécules entrant dans la  
20 préparation des compositions de l'invention sont disponibles commercialement.

Un autre avantage du procédé permettant la préparation des compositions de l'invention est qu'il permet d'utiliser une grande variété de tensioactifs.

Selon un autre avantage, l'invention fournit un véhicule permettant,  
25 vraisemblablement du fait de sa structure spécifique, de protéger l'acide nucléique des agressions extérieures, en particulier des agressions enzymatiques. Ce point est illustré par l'exemple 1. Ceci constitue un net avantage par rapport aux liposomes et aux vésicules paucilamellaires classiques qui ne sont que très peu efficaces en transfection, probablement parce qu'ils ne sont pas capables de protéger l'ADN de  
30 l'action des DNases présentes en particulier dans l'endosome. La force de la technologie de l'invention est en partie due à cette protection des acides nucléiques vis-à-vis des nucléases. On peut supposer, sans que cela constitue une explication certaine dans l'état actuel des connaissances des inventeurs, que les premières couches de la vésicule multilamellaire sont effectivement détruites par l'action  
35 enzymatique dans l'endosome, mais qu'il reste suffisamment d'ADN encapsulé lors de la rupture de l'endosome, pour avoir libération de cet ADN dans le cytoplasme,

ainsi capable d'atteindre le noyau. De plus, la forte concentration en tensioactifs dans les vésicules de l'invention pourrait favoriser, lors de l'érosion des premières couches, la déstabilisation de l'endosome par action des tensioactifs libérés sur les parois de l'endosome.

5                   Selon un autre de ses avantages, l'invention permet, le cas échéant, d'incorporer dans les compositions, des produits à caractère cationique déjà connus pour leur intérêt en transfection, les autres ingrédients de la composition de l'invention permettant de masquer le caractère cationique de cette molécule, permettant ainsi de l'utiliser pour des applications *in vivo*. Ainsi, l'invention fournit  
10                   donc, en outre, un moyen d'augmenter l'efficacité ou de diminuer la toxicité d'une molécule cationique connue pour son utilisation en transfection. En effet, la plupart des composés cationiques utilisés sont cytotoxiques et on peut diminuer cette cytotoxicité en encapsulant ces molécules, ce qui constitue un avantage complémentaire de l'invention.

15                   D'autres avantages découlent de la description et des exemples qui suivent d'où il ressort que ce type de vecteur permet de surmonter sensiblement tous les problèmes exposés précédemment et d'offrir, pour la première fois, un véhicule sous forme de vésicules à base de tensioactifs utilisable *in vivo*.

                  L'invention concerne, selon l'une de ses caractéristiques essentielles,  
20                   une composition contenant au moins un acide nucléique dont au moins une partie se trouve inclus à l'intérieur de vésicules multilamellaires, caractérisée en ce que lesdites vésicules sont constituées de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites bicouches étant concentriques et conférant auxdites vésicules une structure en oignon.

25                   Par structure en "oignon", on entend, comme exposé précédemment, une structure multilamellaire, dans laquelle les vésicules de forme sensiblement sphérique sont constituées d'une succession de bicouches concentriques et, cela, du centre à la périphérie des vésicules, d'où le nom de structure en oignon utilisé, par analogie, pour qualifier de telles structures.

30                   De telles structures sont avantageusement obtenues par incorporation d'au moins un acide nucléique dans une phase lamellaire cristal-liquide comprenant au moins un agent tensioactif puis transformation de cette phase cristal-liquide lamellaire en une phase dense de vésicules multilamellaires de petite taille.

35                   Ainsi, selon une autre caractéristique essentielle de l'invention, elle concerne un procédé de préparation d'une composition contenant au moins un

acide nucléique telle que définie précédemment, selon lequel on prépare une phase cristal-liquide lamellaire incorporant ledit acide nucléique et on provoque le réarrangement de ladite phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires par application d'un cisaillement.

5 Ce cisaillement pourra être un cisaillement homogène, ce qui présente l'avantage de conduire à des vésicules de taille parfaitement homogène. Toutefois, une simple agitation mécanique pourra s'avérer suffisante pour conduire à la formation des vésicules multilamellaires de l'invention.

10 Selon une autre caractéristique encore, l'invention concerne les produits susceptibles d'être obtenus par ce procédé.

Selon le brevet français FR-2 689 418, cette transformation peut être faite lors d'une étape de cisaillement homogène de la phase cristal-liquide, ce qui conduit à des vésicules ou microcapsules de taille contrôlée. Toutefois, en jouant sur la formulation de la phase lamellaire cristal-liquide, en particulier sur la nature  
15 des tensioactifs entrant dans sa composition, la transformation de cette phase cristal-liquide en vésicules peut être obtenue par simple sollicitation mécanique, en particulier lors du mélange des constituants.

La formulation fait avantageusement intervenir un mélange de molécules tensioactives. Il est généralement utilisé au moins deux tensioactifs  
20 différents ayant des balances hydrophile lipophile différentes, ce qui permet de régler en continu les propriétés des bicouches et ainsi de contrôler l'apparition de l'instabilité qui gouverne la formation des vésicules multilamellaires.

Selon une variante avantageuse, les vésicules constituant les compositions de la présente invention ont des dimensions inférieures à 1  $\mu\text{m}$ , de  
25 préférence comprises entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$ .

Selon une autre variante avantageuse de l'invention, les tensioactifs constituant les bicouches des vésicules sont des tensioactifs non cationiques, ce qui présente, comme on l'a vu précédemment, un gros avantage par rapport aux compositions de l'art antérieur mettant en oeuvre des molécules cationiques.

30 Selon une variante avantageuse, les membranes des vésicules contenues dans les compositions de l'invention contiennent avantageusement au moins un agent tensioactif choisi dans le groupe constitué :

- des phospholipides hydrogénés ou non hydrogénés,
- des acides gras en  $\text{C}_6$  à  $\text{C}_{18}$ , saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou  
35 ramifiés, sous forme d'acide ou de sel d'un métal alcalin, alcalino-terreux ou d'une amine,



- des esters, éthoxylés ou non, de ces mêmes acides gras et
  - . de saccharose,
  - . de sorbitan
  - . de mannitol,
  - 5 . de glycérol ou de polyglycérol,
  - . de glycol,
- des mono-, di- ou triglycérides ou des mélanges de glycérides de ces mêmes acides gras,
- des alcools gras en C<sub>6</sub> à C<sub>18</sub>, saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou
  - 10 ramifiés, éthoxylés ou non,
- des éthers, éthoxylés ou non, de ces mêmes alcools gras et
  - . de saccharose,
  - . de sorbitan,
  - . de mannitol,
  - 15 . de glycérol ou de polyglycérol,
  - . de glycol,
- des huiles végétales polyéthoxylées, hydrogénées ou non hydrogénées,
- des polymères séquencés de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène (poloxamères),
  - 20 - de l'hydroxystéarate de polyéthylèneglycol,
  - des alcools à squelette stérol tel que le cholestérol, le sistostérol.

Selon une variante avantageuse, les tensioactifs entrant dans la composition des bicouches des vésicules sont constitués de tensioactifs non cationiques.

- 25 Les tensioactifs choisis, en particulier les tensioactifs cités ci-dessus, sont avantageusement choisis dans la catégorie des tensioactifs permis par la législation pour l'utilisation pharmaceutique en fonction de la voie d'administration.

- 30 On choisira avantageusement parmi les tensioactifs ci-dessus, deux tensioactifs présentant des propriétés relativement différentes, en particulier une balance hydrophile lipophile (HLB) différente. Le premier tensioactif présentera avantageusement une balance hydrophile lipophile comprise entre 1 et 6 alors que le deuxième tensioactif aura une balance hydrophile lipophile comprise entre 3 et 15.

Comme on l'a vu précédemment, un meilleur contrôle de la taille des vésicules multicouches pourra être obtenu en procédant selon le brevet FR 2 689 418.

5 La préparation obtenue après transformation de la phase lamellaire cristal-liquide en vésicules multilamellaires peut ensuite être diluée, en particulier avec un solvant aqueux pour obtenir ainsi une suspension aqueuse de vésicules.

Comme exposé précédemment, un des inconvénients des vecteurs d'acides nucléiques connus à ce jour, en particulier des vecteurs de type liposome, est de ne permettre que rarement de dépasser des rendements d'encapsulation de 10 30 %. Le procédé utilisé pour préparer les vésicules selon l'invention permet, quant à lui, d'atteindre des rendements d'encapsulation qui peuvent être voisins de 100 %. Toutefois, un tel rendement d'encapsulation, du fait de la grande activité obtenue grâce à la structure particulière des vésicules de l'invention ne s'avère pas toujours nécessaire.

15 Ainsi, le rendement d'encapsulation du(des) acide(s) nucléique(s) dans les compositions de l'invention est avantageusement d'au moins 10 %, de préférence d'au moins 40 % mais peut également être compris entre 60 et 100 %, ce qui représente un avantage supplémentaire par rapport aux technologies de l'art antérieur.

20 Les compositions de l'invention contenant des vésicules renfermant au moins un acide nucléique peuvent être utilisées pour des applications *in vitro*, en particulier pour transformer une lignée cellulaire, en particulier pour l'immortaliser ou en modifier l'expression d'un ou plusieurs gènes.

L'invention fournit un moyen de vectorisation d'acides nucléiques, 25 cette vectorisation pouvant être réalisée aussi bien *in vivo* que *in vitro*.

Ces vésicules peuvent également être utilisées pour la préparation de compositions pharmaceutiques utilisables en thérapie génique.

A titre d'exemples d'acide nucléique que peuvent renfermer les vésicules de l'invention, on citera l'ADN ou une séquence nucléotidique d'ADN.

30 Les vésicules peuvent également renfermer un gène particulier ou une séquence de ce gène, plus particulièrement une séquence codant pour une protéine donnée.

Les compositions de l'invention peuvent également inclure dans les vésicules de l'ARN ou une séquence nucléotidique d'ARN.

On peut également, selon une autre variante de réalisation, inclure dans les vésicules un oligonucléotide, cet oligonucléotide pouvant être de type sens et/ou anti-sens.

Les vésicules de l'invention ont avantageusement une taille inférieure à 1  $\mu\text{m}$ , de préférence comprise entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$ . Cette taille pourra être contrôlée et limitée par l'application d'un cisaillement homogène sur la phase cristal-liquide selon le procédé du brevet FR-2 689 418 ou WO 9319735.

Selon des variantes particulièrement intéressantes de l'invention, différents produits pourront être co-encapsulés avec l'acide nucléique en vue, en particulier, soit d'améliorer les conditions d'action de cet acide nucléique, soit d'apporter des fonctionnalités complémentaires à celle du produit encapsulé.

De telles compositions pourront être produites par le procédé précédemment décrit, en incorporant le produit à co-encapsuler en combinaison avec l'acide nucléique dans la phase cristal-liquide.

Parmi les produits que l'on co-encapsulera avantageusement avec les acides nucléiques, on citera, en particulier, les produits de type "agents de condensation" qui forment avec l'acide nucléique une sorte de complexe favorisant le "repliement" de la chaîne d'acide nucléique, ce qui favorise sa stabilité en présence de nucléases.

A titre d'exemple préféré d'agents de condensation, on citera les histones qui sont des protéines, existant naturellement dans le noyau pour condenser l'ADN. Les histones présentent la particularité de rester étroitement liées à l'ADN et sont ainsi susceptibles de jouer un rôle important dans beaucoup de réactions génomiques. Parmi les histones que l'on encapsulera avantageusement en combinaison avec au moins un acide nucléique, en particulier avec l'ADN, on citera les histones dites nucléosomiques, responsables du repliement de l'ADN en nucléosome, plus précisément les histones H2A, H2B, H3 et H4 et l'histone H1 qui ne participe pas directement au repliement de l'ADN en nucléosome, mais à l'empilement de ces derniers. L'utilisation d'un mélange d'histones H1, H2A, H2B H3 et H4 (issues du thymus de veau) utilisées avec un rapport de 1  $\mu\text{g}$  de protéines totales/ $\mu\text{g}$  d'ADN a ainsi permis de condenser 50  $\mu\text{g}$  d'ADN avec un rendement d'encapsulation maximal dans les vésicules de l'invention.

Selon d'autres variantes de l'invention, on co-encapsulera avantageusement dans la vésicule multilamellaire de l'invention différentes enzymes, en particulier des enzymes d'intégration, de recombinaison ou des

enzymes destinées à optimiser la réplication de l'acide nucléique encapsulé tels que les topoisomérases ou les hélicases.

5 Ainsi, selon une variante de l'invention, on pourra co-encapsuler dans la vésicule multilamellaire des enzymes d'intégration dont la fonction est de permettre au gène introduit dans une cellule de s'exprimer dans la cellule hôte, mais surtout de s'intégrer au génome, pour donner des lignées de cellules filles gardant la fonction apportée par le gène introduit. A ce jour, seule l'utilisation des rétrovirus comme vecteur d'ADN permet un transfert de gènes stable et efficace, de par l'intégration du génome viral dans la cellule hôte. Toutefois, on ne peut écarter  
10 tous les problèmes liés à l'utilisation des rétrovirus dans le domaine biomédical. Ainsi, la force de la technologie de l'invention est de pouvoir co-encapsuler l'ADN avec des protéines, en particulier des enzymes permettant cette intégration désignées par les enzymes d'intégration. On peut ainsi apporter dans un même vecteur l'ADN et les outils nécessaires à son incorporation.

15 Il est ainsi possible de stimuler cette intégration génomique par l'addition d'enzymes de recombinaison spécifiques du site qui permettent d'introduire, voire d'éliminer, des séquences nucléotidiques données. Cette forme de recombinaison est appelée recombinaison spécifique de site car l'enzyme de recombinaison appelée intégrase reconnaît des séquences nucléotidiques pouvant  
20 être introduites dans un vecteur d'ADN susceptible de se recombiner avec l'ADN de la cellule hôte. Cette enzyme de recombinaison rapproche les sites spécifiques, initie la réaction de coupure et de soudure de l'ADN.

D'autres outils enzymatiques peuvent également être intégrés dans le vecteur. L'ADN est répliqué chez les organismes eucaryotes en forme de chromatine dans laquelle l'ADN est fortement associé aux histones, protéines qui  
25 peuvent être également utilisées selon la présente invention pour optimiser la quantité d'ADN encapsulé. Si cette structure condensée en nucléosomes empilés, agit comme une barrière qui stopperait par exemple, les enzymes responsables de la réplication, l'association de l'ADN condensé avec des enzymes telles que les  
30 topoisomérases ou les hélicases permet de résoudre les éventuels problèmes d'enroulement de l'hélice ou d'ouverture de celle-ci.

Comme on l'a vu précédemment, un des avantages des compositions de l'invention est qu'elles fournissent un véhicule d'acide nucléique ne contenant pas de molécule à caractère cationique.

35 Toutefois, selon une variante de l'invention, il est possible d'inclure certains adjuvants cationiques, la présence des vésicules multilamellaires de

l'invention permettant de masquer leur toxicité ou d'augmenter leur activité. Il semble que l'effet de certains adjuvants cationiques est de permettre de fixer de façon électrostatique les vésicules sur les parois des cellules, ce qui explique l'augmentation d'efficacité des vecteurs. De plus, il apparaît que le fait d'encapsuler une partie des molécules cationiques permet de diminuer leur cytotoxicité, l'encapsulation diminuant le pourcentage de molécules cationiques susceptibles d'entrer en contact avec les cellules environnantes.

L'encapsulation permet aussi de réduire la concentration en molécule cationique utilisée, grâce à l'effet de synergie qui en améliore l'efficacité.

10           Ainsi donc, il est possible de co-encapsuler dans les vésicules selon l'invention un adjuvant cationique en évitant les inconvénients connus selon l'art antérieur lors de l'utilisation de tels produits.

Les vésicules comprenant l'acide nucléique pourront également, selon des variantes particulièrement intéressantes de l'invention, être modifiées en surface en vue d'être mieux reconnues par la cible visée. Selon cette variante, on adjoindra aux vésicules des molécules, en général des protéines, qui leur permettront d'être reconnues spécifiquement par certaines cibles dans l'organisme, et donc d'augmenter d'une part la sélectivité de la transfection et d'autre part son efficacité. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées, en particulier le recours aux anticorps monoclonaux. Dans tous les cas il est nécessaire de fixer le système de ciblage sur la surface de la vésicule, pour que son efficacité de reconnaissance soit maximale. Cette fixation peut être réalisée par des méthodes physiques (adsorption) ou bien chimiques. Dans les deux cas, la facilité d'obtention et de manipulation des vésicules de l'invention sont des atouts majeurs pour la réussite de ces greffages de fonctions à la surface des vecteurs. Une des applications importantes dans le domaine biomédical est l'utilisation de vésicules portant à leur surface des anticorps monoclonaux ou des fragments Fab, spécifiques de récepteurs de surface cellulaire impliqués, par exemple, dans la reconnaissance de particules virales (herpesvirus...) et agissant comme transducteur de la réponse cellulaire.

L'invention concerne, suivant d'autres caractéristiques essentielles, des compositions pharmaceutiques contenant des vésicules telles que définies précédemment renfermant différents acides nucléiques, en suspension dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

35           L'invention concerne également les méthodes de traitement thérapeutique mettant en oeuvre ces compositions.

Selon l'activité biologique ou pharmaceutique envisagée, différents types d'acides nucléiques peuvent être encapsulés.

5 Ainsi, l'encapsulation d'un gène complet pourra être réalisée en vue de fournir une composition pharmaceutique destinée à suppléer un gène déficitaire ou absent. A titre d'exemple, une telle utilisation pourra être faite dans le traitement de la mucoviscidose.

10 L'encapsulation de constructions nucléiques comme des oligonucléotides destinés à induire une surexpression ou une atténuation de l'activité d'un gène spécifique pourra être utilisée dans des applications en cancérologie ou en virologie.

On peut aussi utiliser ces vecteurs dans des modèles de vaccination à partir d'ADN codant pour une protéine antigénique.

15 On peut aussi vectoriser de l'ARN car la vectorisation d'une séquence nucléotidique complémentaire s'hybridant au transcrit inhibe la lecture de l'ARNm par les ribosomes et en empêche sa traduction en une protéine active.

L'invention concerne également l'utilisation des compositions définies précédemment comme agent destiné à transformer une lignée cellulaire.

20 Elle concerne donc un procédé de transformation *in vitro* d'une lignée cellulaire, consistant à traiter ladite lignée par une composition telle que décrite précédemment.

25 Il s'agit, dans ce cas plus précisément, d'amener un gène au niveau du noyau de la cellule de manière à ce qu'il soit intra-nucléaire et/ou intrachromosomique afin d'en modifier sa propre expression et/ou l'expression d'autres gènes codant pour une ou plusieurs protéines, soit d'immortaliser une lignée par incorporation d'un gène viral et/ou d'un oncogène viral.

30 Selon un avantage supplémentaire de la technologie de l'invention, elle fournit des vésicules permettant d'effectuer une transfection en présence de sérum, ce qui est impossible à réaliser avec des vésicules de l'art antérieur. Ceci constitue un progrès considérable qui permet d'envisager pour la première fois l'utilisation de vésicules à base de tensioactifs *in vivo*.

35 Ce point a été vérifié par des essais de transfection *in vitro* sur des lignées cellulaires, et sur des cultures primaires de cellules humaines différenciées. Des résultats de transfection aussi bons en présence qu'en absence de sérum de veau foetal ont pu être obtenus alors que les autres vecteurs artificiels connus à l'heure actuelle (lipides cationiques) ne fonctionnent pas dans un tel milieu. Ce

dernier résultat est fondamental car il est une condition *sine qua non* de l'utilisation *in vivo*.

Les premiers résultats de transfection *in vivo* sont très encourageants. Ces résultats ont montré que le transfert de gènes pouvait se faire en site tumoral et en injection systémique. L'injection intraveineuse chez l'animal, de vésicules selon l'invention encapsulant le gène de la  $\beta$ -galactosidase permet d'induire une activité galactosidase dans différents organes (coeur, poumon, foie). Ce point est très encourageant pour l'utilisation à des fins thérapeutiques du procédé.

10           Ainsi, l'invention concerne également l'utilisation de vésicules multilamellaires à structure en oignon pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à corriger ou pallier une fonction cellulaire déficiente ou altérée ou à apporter une nouvelle fonction à une cellule, notamment dans le domaine de la cancérologie, de la virologie ou de la correction des défauts osseux.

15           Ainsi, les applications de ce vecteur touchent plusieurs domaines de la recherche biomédicale, en particulier la cancérologie. Dans ce domaine, les premiers résultats ont été obtenus chez des souris portant des tumeurs. Des injections de vésicules encapsulant un gène rapporteur ont été effectuées et une activité génique a été identifiée au niveau de la tumeur. Il devient alors possible  
20 d'envisager l'utilisation de tels vecteurs portant des gènes codant pour des facteurs antimitotiques, ou impliqués dans les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire) afin d'étudier l'effet de ce transfert de gènes sur la régression de la tumeur.

De plus, un autre avantage de ce vecteur est de fonctionner également *in vivo* au niveau d'un site d'implantation donné. Un autre domaine d'application  
25 de ces vecteurs concerne les méthodes actuelles de substitution osseuse. L'implantation dans un défaut osseux de vésicules portant le gène codant pour des protéines ostéoinductrices connues sous le sigle BMPs correspondant à la terminologie anglaise "Bone Morphogenetic Proteins" devrait favoriser l'ostéogénèse. Si l'avenir de ces facteurs ostéoinducteurs dans le domaine  
30 orthopédique est très prometteur, il reste néanmoins, à l'heure actuelle, à résoudre le problème majeur de la vectorisation, de la régulation du système de délivrance au site d'implantation sans observer d'effet systémique. La présente invention fournit pour la première fois un vecteur acceptable. Par ailleurs, les injections systémiques de vésicules portant le gène de la  $\beta$ -galactosidase, et les premières  
35 expériences de biodistribution ont montré une activité génique dans différents

organes. L'utilisation d'un tel procédé associé à un ciblage, comme décrit précédemment, offre de grandes perspectives thérapeutiques.

Les exemples ci-dessous sont donnés en référence aux figures 1 à 3 qui représentent respectivement :

- 5           - figure 1 : l'histogramme des rayons exprimés en nm des vésicules multilamellaires préparées selon l'exemple 1 ;
- figure 2, donnée en référence à l'exemple 3, l'efficacité de la transfection du gène de la  $\beta$ -galactosidase sur des cellules fibroblastiques de peau humaine pour deux types de formulations différentes selon l'invention et un
- 10       vecteur commercial ;
- figure 3, donnée en référence à l'exemple 4, les résultats comparatifs de l'efficacité de la transfection du gène de la  $\beta$ -galactosidase sur des fibroblastes humains en utilisant différentes formulations de microvésicules selon l'invention, contenant ou non un adjuvant cationique, en comparaison avec un vecteur
- 15       commercial.

## EXEMPLES

Sauf indications contraires, les quantités et proportions données dans les exemples sont en poids.

20

### Exemple 1

#### Protection vis-à-vis de la DNase

Cet exemple a pour but de montrer l'efficacité des microvésicules multilamellaires selon l'invention pour encapsuler un ADN et le protéger de

25 l'action de l'enzyme DNase. Pour cela, un ADN greffé (ADN-DIG) est encapsulé selon le procédé de l'invention. Les microvésicules contenant l'ADN, ainsi que l'ADN libre, sont ensuite soumises à l'action de l'enzyme. L'intégrité de l'ADN est ensuite révélée par hybridation de l'ADN complémentaire et coloration. On observe alors que l'ADN encapsulé selon le procédé est intact, alors que l'ADN

30 libre a été détruit par l'enzyme.

#### a) Préparation de l'échantillon

10  $\mu$ l d'une solution à 1  $\mu$ g/50  $\mu$ l d'ADN-DIG (Boehringer Mannheim), soit 200 ng d'ADN-DIG sont mélangés à 375  $\mu$ l d'eau, 100 mg d'alcool laurique éthoxylé à 4 molécules d'oxyde d'éthylène (laureth 4 par exemple Lauropal-4-Witco) et 525 mg de lécithine de soja à 90 % de phosphatidylcholine

35



(Phospholipon P90, Natterman). L'eau est préalablement stérilisée par filtration sur un filtre de 0,25  $\mu\text{m}$ , tandis que les tensioactifs sont traités par rayonnement UV. Après mélange à température ambiante, au cours duquel on prend soin d'appliquer un cisaillement homogène et uniforme sur tout l'échantillon, on obtient une pâte, correspondant à la phase cristal-liquide, arrangée sous forme d'assemblée compacte de microvésicules. On laisse reposer cette pâte pendant 24 h.

Pour leur utilisation, on prépare une dispersion des microvésicules en diluant 50 mg de pâte dans 1 ml d'eau stérile.

10 b) Caractérisation

La taille des microvésicules est mesurée par diffusion dynamique de la lumière sur une dispersion à 1 % de la pâte dans l'eau. On obtient une valeur du diamètre de 0,2  $\mu\text{m}$  environ. Cette valeur est confirmée par microscopie électronique (cryofracture). Les résultats de mesure de taille sont indiqués sur la figure 1 donnant l'histogramme de la distribution de taille, observée par microscopie. Un contrôle plus précis de la taille peut être obtenu en utilisant le procédé décrit dans le brevet WO-A-93 19735.

c) Protocole d'essai

20 On prépare une dispersion de base des microvésicules contenant l'ADN à partir de 50 mg de pâte, dispersée dans 1 ml d'eau. Cette dispersion de base est ensuite diluée dans l'eau pour obtenir 5 dispersions d'essais, contenant de 10 ng/ml à 1 pg/ml d'ADN, par variation d'un facteur 10. On prépare des solutions d'ADN-DIG libre de mêmes concentrations pour servir de témoins.

25 Ces dispersions sont mises en contact pendant 1 h à 37°C avec une solution de DNase I (Boehringer Mannheim) dans une proportion de 2 unités de DNase pour 1  $\mu\text{g}$  d'ADN. Dans un deuxième temps, la présence ou non d'ADN-DIG est révélée par fixation sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C super) puis par hybridation avec l'ADN-DIG complémentaire en utilisant la technique du "dot-blot". La membrane est ensuite révélée par coloration aux NBT/BCIP suivant le protocole développé par Boehringer Mannheim et publié dans Genius, Applications Manuel, Boehringer-Mannheim Biochemicals Indianapolis 5-7, 1989.

35

d) Résultats

On constate par analyse du "dot-blot" que :

- . l'ADN libre non traité par la DNase est visualisé par la technique du "dot-blot"
- . l'ADN libre traité par la DNase est totalement détruit, pour toutes les concentrations
- 5 . l'ADN encapsulé selon le procédé de l'invention, non traité à la DNase est visualisé par cette même technique
- . l'ADN encapsulé selon le procédé de l'invention, traité à la DNase reste nettement visible, et est donc protégé de l'action enzymatique
- . les microvésicules vides (sans ADN) ne donnent pas de réaction visible dans
- 10 l'analyse, ce qui écarte tout risque de faux positif.

Une analyse plus fine de l'intensité comparée des images de "dot-blot" permet d'évaluer qu'environ 80 % de l'ADN a été protégé de l'action enzymatique. On peut en déduire que les 20 % détruits correspondent à l'ADN résiduel non encapsulé, ce qui permet d'évaluer le taux d'encapsulation aux environs de 80 %.

- 15 Ces résultats ont été confirmés par une expérience d'électrophorèse sur un gel d'agarose, qui n'a montré aucune dégradation de l'ADN.

## Exemple 2

### Interaction entre l'ADN encapsulé et cellules en culture

- 20 Le but de cet exemple est de montrer qu'un ADN encapsulé selon le procédé de l'invention est capable de pénétrer à l'intérieur de cellules, d'y être relâché, et d'atteindre le noyau. Pour cela, on couple un ADN plasmidique à une sonde fluorescente, qui permettra une visualisation de l'incorporation cellulaire par microscopie de fluorescence.

25

#### a) Préparation de l'échantillon

- L'ADN plasmidique (pBR 322, de 4363 paires de base, Promega) à une concentration de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  est couplé à la fluorescéine (sonde YoYo-1, Molecular Probe Inc.) puis encapsulé dans des microvésicules multilamellaires, selon le
- 30 même mode opératoire que pour l'exemple 1, avec :
- solution aqueuse d'ADN YoYo : 37,5 %
- Alcool laurique éthoxylé à 4 mole d'OE : 10 %
- Lécithine de soja (90 % de phosphatidylcholine) : 52,5 %

35

#### b) Incubation des cellules :

Les diverses lignées cellulaires, fibroblastes humains (culture primaire), NIH 3T3 (ATCC) sont maintenues dans des conditions classiques de culture (IMDM, Gibco, Life technology), contenant 10 % de sérum de veau (Gibco, Life technology), 10 000 U de pénicilline-streptomycine (Gibco, Life technology) à 37°C, en atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont mises en présence d'une dispersion à 10 % de microvésicules contenant l'ADN pendant 5 min, dans un milieu IMDM seul. Après ce temps d'incubation, les cellules sont lavées pour éliminer les dispersions de vésicules puis visualisées.

c) Résultat

Les cellules sont visualisées par microscopie de fluorescence, après différentes durées d'incubation.

. A t = 0, (pour contrôle, avant lavage) on observe les microvésicules dans le milieu surnageant comme des points fluorescents.

. A t = 5 min, les microvésicules fluorescentes sont visualisées au contact de la surface des cellules. On note le début d'une diffusion intracytoplasmique de la fluorescence.

. A t = 1 heure, on observe la diffusion intracytoplasmique de la fluorescence. Le pourtour nucléaire est nettement apparent, un début de fluorescence au niveau du noyau apparaît.

. Entre t = 2 et 8 heures, la fluorescence commence à apparaître dans le noyau. Elle reste forte dans le cytoplasme.

. A t = 48 heures, la fluorescence est plus faible et ne subsiste qu'à proximité des noyaux.

Cet exemple montre que l'ADN a pu être incorporé dans les fibroblastes, puis a traversé le cytoplasme pour atteindre le noyau.

Exemple 3

Encapsulation d'un gène et mise en évidence du transfert et de l'expression transitoire de ce gène

Le but de cet exemple est de montrer qu'un gène encapsulé dans les microvésicules multilamellaires de l'invention peut être incorporé dans le noyau d'une cellule et s'exprimer. Le test retenu est l'utilisation du gène qui code pour la  $\beta$ -galactosidase, et dont l'expression est mise en évidence par la coloration bleue des noyaux des cellules transfectées, lors de la réaction avec le substrat X-GAL. Dans cet exemple, l'efficacité de transfection est comparée à celle d'un vecteur commercial, le LipofectAce® (Life Technology).

a) Préparation des microvésicules

Les microvésicules contenant le gène qui code pour la  $\beta$ -galactosidase (LacZ) sont préparées selon le mode opératoire de l'exemple 1, en utilisant une solution aqueuse du gène, à 10 mg/ml. Trois types de gène de type LacZ modifié ont été essayés : pRSCLacZ, pCHLacZ et pRSVLacZ-Sal-1. Chaque gène a été coencapsulé avec de la polylysine en concentration 100  $\mu$ M, de poids moléculaire soit 3,5 kDa, soit 10 kDa. La composition des microvésicules est la suivante :

5	Lécithine de soja à 90 % de phosphatidylcholine.....	41,5 %
10	Cholestérol (Sigma).....	3,5 %
	Oléate de potassium .....	5 %
	Solution aqueuse d'ADN et de polylysine.....	49,5 %.

Pour l'incubation des cellules, les microvésicules sont dispersées dans l'eau, afin d'obtenir un milieu d'incubation contenant 10  $\mu$ g/ml d'ADN.

b) Transfection

Les cellules (fibroblastes humains, culture primaire) sont maintenues dans des conditions classiques de culture comme dans l'exemple 2. Pour l'incubation, le milieu est remplacé par un milieu IMDM contenant 100  $\mu$ M de chloroquine, et sans sérum. L'incubation avec les microvésicules dure de 2 à 12 heures. Les cellules sont ensuite lavées et maintenues en culture pendant 48 heures dans un milieu complet (IMDM, sérum, pénicilline-streptomycine).

La visualisation de la transfection est effectuée par lavage des cellules, fixation, et addition du substrat X-GAL (Biosynth AG). Ce substrat est clivé par l'enzyme correspondant au gène de la  $\beta$ -galactosidase, en donnant un précipité bleu foncé exclusivement intracellulaire dû au signal intranucléaire désigné généralement par "nls", selon la terminologie anglaise "nuclear localisation signal".

La même expérience est effectuée, pour comparaison, en utilisant un vecteur commercial LipofectAcc<sup>®</sup> (Life Technology), utilisé selon le protocole du fabricant, avec les mêmes concentrations de gène.

c) Résultat

Les résultats, sous forme de pourcentage de cellules transfectées sont donnés sur la figure 2. Chaque histogramme correspond à un des gènes (de gauche à droite : pRSCLacZ, pCHLacZ et pRSVLacZ-Sal-1). Sur chacun, on a porté le pourcentage de transfection obtenu avec, de gauche à droite LipofectAcc<sup>®</sup>, les

microvésicules avec la polylysine de 3,5 kDa et les microvésicules avec la polylysine de 10 kDa.

On constate que, dans tous les cas, les résultats sont meilleurs en utilisant les microvésicules qu'avec le vecteur commercial. Des pourcentages de 25 à 35 % de transfection sont obtenus dans le cas des microvésicules.

Un test à la DNase identique à celui décrit dans l'exemple 1 peut être effectué sur ce gène rapporteur, en utilisant pour la technique du "dot-blot" un cDNA marqué au  $^{32}\text{P}$ . On constate alors que, comme dans l'exemple 1, l'ADN encapsulé dans les microvésicules selon l'invention n'est pas détruit par la DNase. Par contre, le rendement d'encapsulation observé est plus faible. Le même test de protection vis-à-vis de la DNase effectué sur ce même gène vectorisé par le produit commercial ne montre aucune protection de ce type de vecteur, ce qui pourrait expliquer le faible taux de transfection obtenu pour ce produit commercial.

#### Exemple 4

##### Encapsulation d'un gène et mise en évidence du transfert et de l'expression transitoire de ce gène : effet d'adjuvants cationiques

Cet exemple a pour but de mettre en évidence la possibilité d'utilisation d'adjuvants de type cationique pour améliorer l'efficacité de la transfection. L'adjuvant utilisé est un polymère, la polyéthylèneimine. Plusieurs essais sont réalisés, dans des conditions analogues à celles de l'exemple 3 (transfection du gène de la  $\beta$ -galactosidase), mais sans utiliser de polylysine. Pour comparaison deux formulations avec polylysine, mais sans adjuvant, sont préparées, l'une identique à celle de l'exemple 3 (lécithine, oléate de potassium, cholestérol), l'autre identique à celle de l'exemple 1 (lécithine, laureth 4). Enfin, pour contrôle, trois expériences de transfection sont effectuées en utilisant soit un vecteur commercial LipofectAcc<sup>®</sup> (Life Technology), soit de l'ADN non encapsulé, complexé à la polyéthylèneimine.

##### a) Préparation des microvésicules

Le mode opératoire est strictement identique à celui utilisé dans l'exemple 3, en utilisant comme gène le pRSVLacZ. La polyéthylèneimine (masse molaire 50 kDa, Sigma) est additionnée à la solution aqueuse d'ADN avant encapsulation, à deux concentrations : 10 mM et 100  $\mu\text{M}$ .

Les témoins sans polyéthylèneimine sont préparés selon le mode opératoire de l'exemple 3 (lécithine, cholestérol, oléate de potassium), ou de l'exemple 1 (lécithine, laureth 4).

5    b) Transfection

Le protocole est identique à celui de l'exemple 3. La transfection est effectuée sur des fibroblastes humains (culture primaire). Dans tous les cas, la concentration en gène dans le milieu d'incubation est de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

10    Les expériences avec l'ADN non encapsulé sont effectuées en introduisant dans le milieu d'incubation, à la place de la dispersion de vésicules selon l'invention, une solution contenant l'ADN et la polyéthylèneimine préalablement mélangés.

c) Résultat

15    Les résultats, donnés sous la forme d'un histogramme des pourcentages de cellules transfectées, sont donnés sur la figure 3. Les résultats correspondent, de gauche à droite aux essais suivants :

1-microvésicules à base de lecithine et d'oléate de potassium

20    2-microvésicules à base de lecithine et d'alcool laurique à 4 molécule d'oxyde d'éthylène (laureth 4)

3-microvésicules à base de lecithine et d'oléate de potassium, co-encapsulant la polyéthylèneimine, en concentration 10 mM

4-microvésicules à base de lecithine et d'oléate de potassium, co-encapsulant la polyéthylèneimine, en concentration 100  $\mu\text{M}$

25    5-ADN complexé au polyéthylèneimine, avec une concentration en polymère de 10 mM

6-ADN complexé à la polyéthylèneimine, avec une concentration en polymère de 100  $\mu\text{M}$

7-utilisation du vecteur commercial LipofectAcc<sup>®</sup> (Life Technology).

30    On observe que grâce à la co-encapsulation de la polyéthylèneimine, le taux de cellules transfectées atteint 35 %. L'ADN non encapsulé, simplement complexé par la polyéthylèneimine est aussi transfecté, mais présente alors un moins bon taux de transfection. Tous les essais effectués avec des vecteurs basés sur l'oléate de potassium, avec ou sans adjuvant, donnent un résultat meilleur que  
35    le vecteur commercial.

Exemple 5Encapsulation d'un gène et mise en évidence du transfert et de l'expression transitoire de ce gène : effet d'adjuvants non cationiques

Cet exemple a pour but de mettre en évidence la possibilité de co-encapsulation d'adjuvants non cationiques de condensation de l'ADN pour améliorer l'efficacité de transfection. L'adjuvant utilisé est un mélange d'histones H1, H2a, H2b, H3, H4 de thymus de veau (fournisseur : Boehringer). L'ADN utilisé est le même que celui utilisé dans l'exemple 4.

10 a) Condensation de l'ADN par les histones

L'ADN est préalablement condensé par mise en solution simultanée d'un poids égal d'ADN et du mélange d'histones H1, H2a, H2b, H3, H4 de thymus de veau (50 µg d'ADN avec 50 µg de mélange d'histones dans 12 µl d'eau) et incubation du mélange pendant 10 min à 37°C.

15

b) Préparation des microvésicules

Le mode opératoire est strictement identique à celui utilisé dans l'exemple 3, en utilisant à la place de la solution de gène, la solution de mélange ADN/histones.

20

La composition en poids des vésicules est :

lécithine de soja à 90% de phosphatidyl choline :	31,5 %
cholesterol	6,5 %
alcool laurique éthoxylé à 4 OE	2 %
solution aqueuse du mélange ADN/histones	60 %

25

c) Mesure du rendement d'encapsulation

1 µg d'ADN a été marqué au <sup>32</sup>P (selon la méthode dite du random priming) et mélangé avec 49 µg d'ADN non marqué (pour respecter la quantité de 50 µg d'ADN). Cet ADN est encapsulé puis les vésicules sont dispersées dans de l'eau. La suspension est ultracentrifugée à 30 000 rpm pendant 45 minutes. Le surnageant est séparé du culot et chacun est mis à compter dans un compteur β pour évaluer la radioactivité présente.

30

Le rendement d'encapsulation mesuré est toujours supérieur à 80%

d) Transfection

35

Les essais de transfection sont effectués sur des fibroblastes de peau humaine selon un protocole d'incubation et de comptage identique à celui décrit

dans les exemples 3. La concentration d'ADN utilisée dans la dispersion mise au contact des cellules est de 5 µg/ml.

Le pourcentage de transfection dans ces conditions varie de 20 à 30 % (défini comme le nombre de cellules transfectées par rapport aux cellules incubées).



## REVENDICATIONS

1. Composition contenant au moins un acide nucléique dont au moins une partie se trouve incluse à l'intérieur de vésicules multilamellaires, caractérisée en ce que lesdites vésicules sont constituées de bicouches comprenant au moins un agent tensioactif, lesdites bicouches étant concentriques et conférant auxdites vésicules une structure en oignon.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdites vésicules ont des dimensions inférieures à 1  $\mu\text{m}$ , de préférence comprises entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$ .

3. Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que les tensioactifs constituant lesdites bicouches desdites vésicules sont des tensioactifs non cationiques.

4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que lesdits agents tensioactifs non cationiques sont choisis dans le groupe constitué :

- des phospholipides hydrogénés ou non hydrogénés,
- des acides gras en  $\text{C}_6$  à  $\text{C}_{18}$ , saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, sous forme d'acide ou de sel d'un métal alcalin, alcalino-terreux ou d'une amine,
- des esters, éthoxylés ou non, de ces mêmes acides gras et
  - . de saccharose,
  - . de sorbitan,
  - . de mannitol,
  - . de glycérol ou de polyglycérol,
  - . de glycol,
- des mono-, di- ou triglycérides ou des mélanges de glycérides de ces mêmes acides gras,
- des alcools gras en  $\text{C}_6$  à  $\text{C}_{18}$ , saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, éthoxylés ou non,
- des éthers, éthoxylés ou non, de ces mêmes alcools gras et
  - . de saccharose,
  - . de sorbitan,
  - . de mannitol,
  - . de glycérol ou de polyglycérol,
  - . de glycol,
- des huiles végétales polyéthoxylées, hydrogénées ou non hydrogénées.

- des polymères séquencés de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène (poloxamères),
- de l'hydroxystéarate de polyéthylèneglycol,
- des alcools à squelette stérol tel que le cholestérol, le sistostérol.

5                    5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les bicouches desdites vésicules comprenant au moins deux agents tensioactifs dont l'un présente une balance lipophile hydrophile (HLB) comprise entre 1 et 6 et l'autre une balance lipophile hydrophile (HLB) comprise entre 3 et 15.

10                   6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'au moins 10 %, et de préférence au moins 40 % dudit(desdits) acide(s) nucléique(s), se trouvent inclus à l'intérieur desdites vésicules multilamellaires.

7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que 60 à 100 % dudit ou desdits acides nucléiques se trouvent inclus dans lesdites vésicules.

15                   8. Composition selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit acide nucléique est de l'ADN ou une séquence nucléotidique d'ADN.

9. Composition selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit acide nucléique est un gène particulier ou une séquence dudit gène, en particulier une séquence codant pour une protéine donnée.

20                   10. Composition selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit acide nucléique est de l'ARN ou une séquence nucléotidique d'ARN.

11. Composition selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit acide nucléique est un oligonucléotide sens et/ou anti-sens.

25                   12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que lesdites vésicules contiennent, en outre, un adjuvant cationique, en particulier une poléthylèneimine, coencapsulé avec ledit acide nucléique.

13. Composition selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un produit co-encapsulé choisi dans le groupe des agents de condensation de l'ADN, en particulier parmi les histones, des enzymes d'intégration ou de recombinaison, des enzymes destinées à optimiser la réplication de l'acide nucléique encapsulé, telles que les topoisomérases ou les hélicases.

30                   14. Composition selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que lesdites vésicules sont modifiées en surface par l'adjonction de molécules leur permettant d'être reconnues spécifiquement par une cible dans l'organisme, en  
35                   particulier par adjonction d'anticorps monoclonaux ou de fragments Fab.

15. Procédé de préparation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'il comprend la préparation d'une phase cristal-liquide lamellaire incorporant ledit acide nucléique et le réarrangement de ladite phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires par application d'un cisaillement.

16. Composition pharmaceutique contenant des vésicules telles que définies dans l'une des revendications 1 à 14, en suspension dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

17. Composition pharmaceutique selon la revendication 16, caractérisée en ce que ledit acide nucléique encapsulé est un gène complet, en particulier un gène destiné à suppléer un gène déficitaire ou absent.

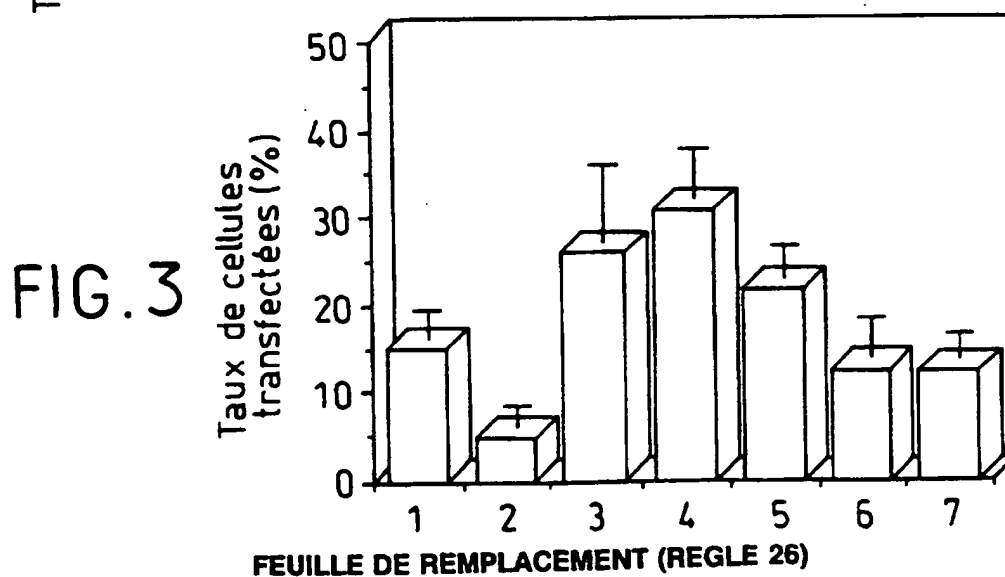
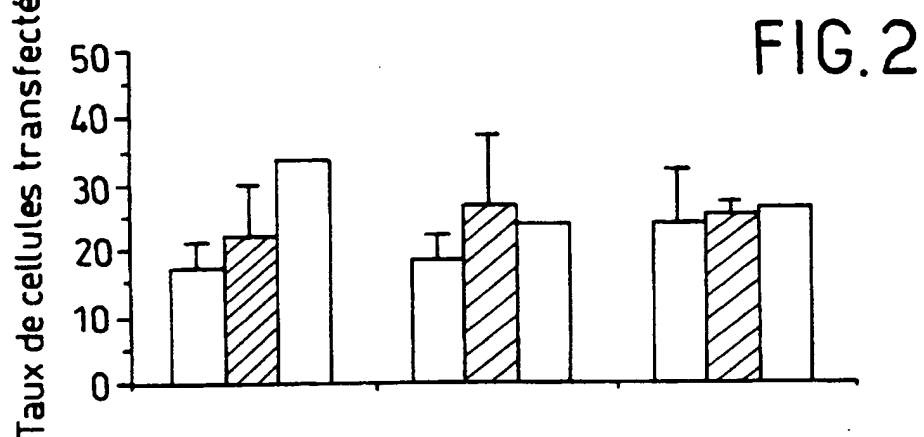
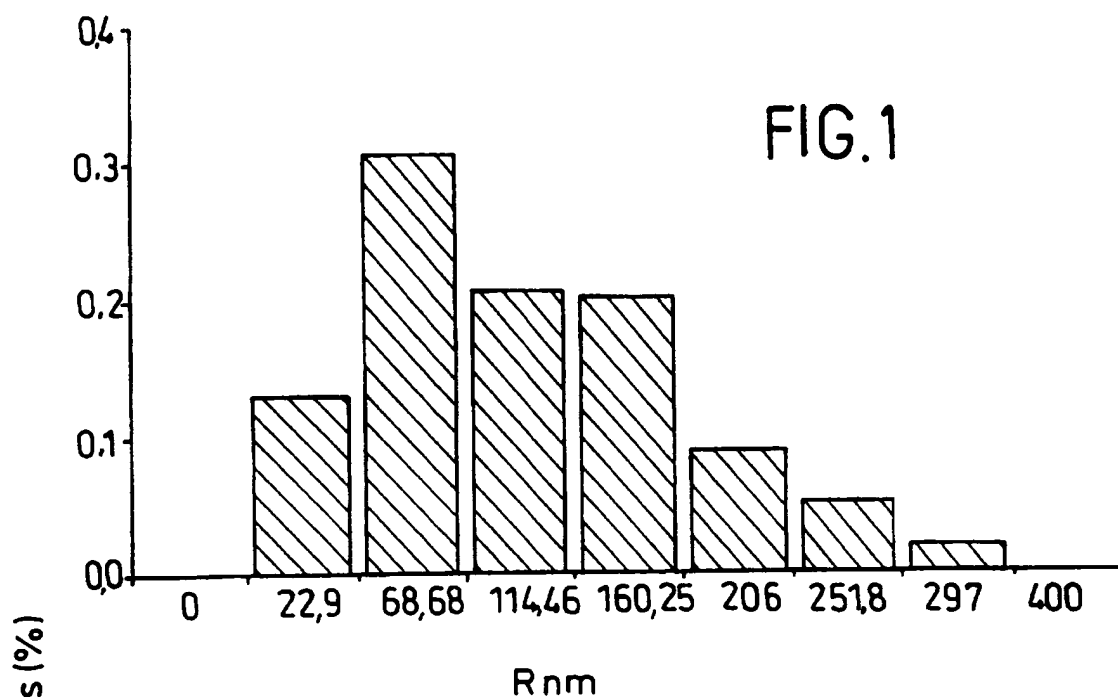
18. Composition pharmaceutique selon la revendication 16, caractérisée en ce que ledit acide nucléique est un oligonucléotide destiné à induire une surexpression ou une atténuation de l'activité d'un gène spécifique.

19. Composition pharmaceutique selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un vaccin, ledit acide nucléique étant un ADN codant pour une protéine antigénique.

20. Utilisation de vésicules multilamellaires à structure en oignon telles qu'elles sont définies dans l'une des revendications 1 à 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à corriger ou pallier une fonction cellulaire déficiente ou altérée ou à apporter une nouvelle fonction à une cellule, notamment dans le domaine de la cancérologie, de la virologie ou de la correction des défauts osseux.

21. Procédé de transformation *in vitro* d'une lignée cellulaire, caractérisé en ce qu'il consiste à traiter ladite lignée par une composition selon l'une des revendications 1 à 14.

1/1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/01304

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K9/127 A61K48/00 C12N15/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S. AKHTAR ET AL.: "interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 19, no. 20, 25 October 1991, EYNSHAM, OXFORD (GB), pages 5551-5559, XP002027215 see page 5553, column 1 see page 5554, column 1 ---	1-4, 6-11, 16-21
X	US 4 394 448 A (SZOKA, JR. ET AL.) 19 July 1983 cited in the application	1-4, 6-10, 16-21
Y	see the whole document  see column 4, line 50 - line 52 ---	5, 12, 13, 15
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 October 1997

Date of mailing of the international search report

11.11.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Benz, K

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/01304

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 16437 A (MICRO VESICULAR SYSTEMS, INC.) 22 June 1995 cited in the application see page 3, line 5 - line 25 see page 16 - page 21; examples 4-6 see claims 18,19 ---	1-11,14, 16-21
Y	WO 95 18601 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)) 13 July 1995 cited in the application see the whole document ---	5,15
Y	EP 0 424 688 A (STADLER ET AL.) 2 May 1991 see page 6, line 51 - page 7, line 1 ---	12
Y	DE 40 05 152 A (KAHL) 22 August 1991 see claim 1 ---	13
P,X	WO 97 10851 A (OPPERBAS HOLDING B.V.) 27 March 1997  see page 4, line 5 - page 5, line 26 ---	1-4, 6-10, 16-21
P,X	WO 97 04748 A (ADVANCED THERAPIES, INC.) 13 February 1997  see page 6, line 26 - page 9, line 11 see page 32, line 1 - page 39, line 14 -----	1-4, 6-11,13, 14,16-21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01304

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4394448 A	19-07-83	US 4235871 A	25-11-80
		BE 874408 A	23-08-79
		DE 2907303 A	06-09-79
		EP 0004223 A	19-09-79
		FR 2418023 A	21-09-79
		GB 2015464 A,B	12-09-79
		US 4394149 A	19-07-83
-----			
WO 9516437 A	22-06-95	AU 680996 B	14-08-97
		AU 1438395 A	03-07-95
		CA 2177695 A	22-06-95
		EP 0734251 A	02-10-96
		US 5665380 A	09-09-97
-----			
WO 9518601 A	13-07-95	FR 2714621 A	07-07-95
		CA 2180480 A	13-07-95
		EP 0737063 A	16-10-96
-----			
EP 424688 A	02-05-91	US 5286634 A	15-02-94
		DE 69019290 D	14-06-95
		DE 69019290 T	12-10-95
-----			
DE 4005152 A	22-08-91	NONE	
-----			
WO 9710851 A	27-03-97	AU 6888496 A	09-04-97
-----			
WO 9704748 A	13-02-97	AU 6691496 A	26-02-97
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der a internationale No  
PCT/FR 97/01304

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 A61K9/127 A61K48/00 C12N15/88

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	S. AKHTAR ET AL.: "interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 19, no. 20, 25 octobre 1991, EYNHAM, OXFORD (GB), pages 5551-5559, XP002027215 voir page 5553, colonne 1 voir page 5554, colonne 1 ---	1-4, 6-11, 16-21
X	US 4 394 448 A (SZOKA, JR. ET AL.) 19 juillet 1983 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-4, 6-10, 16-21
Y	voir le document en entier voir colonne 4, ligne 50 - ligne 52 ---	5,12,13, 15
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 octobre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11.11.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Postbus 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Benz, K



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. , Internationale No

PCT/FR 97/01304

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES C MME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95 16437 A (MICRO VESICULAR SYSTEMS, INC.) 22 juin 1995 cité dans la demande voir page 3, ligne 5 - ligne 25 voir page 16 - page 21; exemples 4-6 voir revendications 18,19 ---	1-11,14, 16-21
Y	WO 95 18601 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)) 13 juillet 1995 cité dans la demande voir le document en entier ---	5,15
Y	EP 0 424 688 A (STADLER ET AL.) 2 mai 1991 voir page 6, ligne 51 - page 7, ligne 1 ---	12
Y	DE 40 05 152 A (KAHL) 22 août 1991 voir revendication 1 ---	13
P,X	WO 97 10851 A (OPPERBAS HOLDING B.V.) 27 mars 1997  voir page 4, ligne 5 - page 5, ligne 26 ---	1-4, 6-10, 16-21
P,X	WO 97 04748 A (ADVANCED THERAPIES, INC.) 13 février 1997  voir page 6, ligne 26 - page 9, ligne 11 voir page 32, ligne 1 - page 39, ligne 14 -----	1-4, 6-11,13, 14,16-21

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Des. Internationale No

PCT/FR 97/01304

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4394448 A	19-07-83	US 4235871 A BE 874408 A DE 2907303 A EP 0004223 A FR 2418023 A GB 2015464 A,B US 4394149 A	25-11-80 23-08-79 06-09-79 19-09-79 21-09-79 12-09-79 19-07-83
WO 9516437 A	22-06-95	AU 680996 B AU 1438395 A CA 2177695 A EP 0734251 A US 5665380 A	14-08-97 03-07-95 22-06-95 02-10-96 09-09-97
WO 9518601 A	13-07-95	FR 2714621 A CA 2180480 A EP 0737063 A	07-07-95 13-07-95 16-10-96
EP 424688 A	02-05-91	US 5286634 A DE 69019290 D DE 69019290 T	15-02-94 14-06-95 12-10-95
DE 4005152 A	22-08-91	AUCUN	
WO 9710851 A	27-03-97	AU 6888496 A	09-04-97
WO 9704748 A	13-02-97	AU 6691496 A	26-02-97